

1/2 - (C) PAJ / JPO

PN - JP3218318 A 19910925

PA - CHUGAI PHARMACEUT CO LTD

I - A61K35/20 ; A61K37/16 ; A61K39/395

TI - PRODUCTION OF TREATING AGENT FOR ROTAVIRUS INFECTIOUS DISEASE

AB - PURPOSE: To obtain native whey protein extremely effective for preventing and treating the title infectious disease of bovine newborns by blending colostrum of a great number of dairy cattle bred in plural zones, de-fattening, subjecting to rennet treatment, subjecting to ultrafiltration under a specific condition, concentrating and purifying.

- CONSTITUTION: Colostrum of more than 50 dairy cattle bred in plural zones is blended, de-fatted and subjected to rennet treatment to give colostrum whey, which is treated by an ultrafilter having 100,000 fractional molecular weight. Then the whey is concentrated until protein content exceeds 75% to purify a native whey protein rich in immunoglobulin, lactoferrin and lactoperoxidase and to give native whey protein useful for effectively preventing and treating

Continue: Y / N

? y

rotavirus infectious diseases of bovine newborns. The protein is orally administered to bovine newborns within 36 hours from birth and a dose is at least 5g per time. Then, a dose of at least 5g/day is applied to the bovine newborns and the administration is continued for a week to effectively prevent rotavirus infectious diseases of bovine newborns.

2/2 - (C) PAJ / JPO

PN - JP3109400 A 19910509

PA - SNOW BRAND MILK PROD CO LTD

I - C07K15/22 ; C07K3/20 ; C12N9/08

TI - METHOD FOR SEPARATING, PURIFYING AND COLLECTING IRON BINDING PROTEIN

AB - PURPOSE: To obtain lactoperoxidase and lactoferrin for medicine in high purity and yield by bringing iron binding protein-containing solution into contact with sulfone group-introducing polysaccharides affinity carrier and successively treating the solution with an aqueous solution different in ion strength.

- CONSTITUTION: A solution containing iron binding protein is brought

Continue: Y / N

? y

into contact with polysaccharides affinity carrier in which a sulfone group is introduced to absorb an iron binding protein and the carrier is cleaned with an aqueous solution or buffer having ≤ 0.2 ion strength and $\text{pH} \leq 5$ and lactoperoxidase absorbed into the carrier is eluted with an aqueous solution or buffer having ≥ 0.5 ion strength and $\text{pH} \geq 5$ to separate and purify lactoperoxidase and/or lactoferrin of iron binding protein from iron binding protein-containing

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-218318

⑬ Int.Cl.⁴

A 61 K 35/20
37/16
39/395

識別記号

ADY
ACR Y

庁内整理番号

8815-4C
8815-4C
8829-4C

⑭ 公開 平成3年(1991)9月25日

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全5頁)

⑮ 発明の名称 ロタウイルス感染症治療剤の製法

⑯ 特 願 平2-293612

⑰ 出 願 平2(1990)11月1日

優先権主張 ⑱ 平1(1989)11月2日 ⑲ 日本(JP) ⑳ 特願 平1-286617

㉑ 発 明 者 安 藤 邦 雄 東京都北区浮間5丁目5番1号 中外製薬株式会社内

㉒ 発 明 者 各 口 裕 巳 東京都北区浮間5丁目5番1号 中外製薬株式会社内

㉓ 出 願 人 中外製薬株式会社 東京都北区浮間5丁目5番1号

㉔ 代 理 人 弁理士 杉山 一夫

明 細 書

1. 発明の名称

ロタウイルス感染症治療剤の製法

2. 特許請求の範囲

(1) 複数の地域で飼育されている50頭以上の乳牛から集めた初乳を混合し、脂肪、レンネット処理を経て調製した初乳ホエイを、分子量10万の限外濾過膜により処理し、更に蛋白質含有量が75%を超えるまで濃縮して、免疫グロブリン、ラクトフェリン、ラクトパーオキシダーゼに富む未変生乳清蛋白質を精製することを特徴とする新生仔のロタウイルス感染症予防治療用未変生乳清蛋白質の製法。

(2) 請求項(1)記載の発明によって製造した未変生乳清蛋白質を、子ウシの出生36時間以内に、少なくとも1回5gを経口投与し、以後毎日最低5gを1週間連続投与することを特徴とするウシ新生仔のロタウイルス感染症の予防法。

(3) 請求項(1)記載の発明によって製造した未変生乳清蛋白質を、粉末としてこれをリングル、タイ

ロード等の電解質補液の粉末と混合し、用時に溶解して経口投与することを特徴とする子ウシの下痢症予防及び治療法。

(4) 請求項(1)記載の発明によって分離調製した初乳の未変生乳清蛋白質を子ウシ代用乳に添加することを特徴とする子ウシの下痢症予防剤及び治療剤。

(5) 請求項(1)記載の発明によってウシ初乳から精製した免疫グロブリン、ラクトフェリン、ラクトパーオキシダーゼに富む未変生乳清蛋白質1部に対し1部以上のバターオイル、大豆油などの中性脂肪を加えると共にレシチン、牛乳脂肪球膜等の乳化剤によって乳化し、免疫グロブリンとして子ウシ一頭一日当たり最低3gを連日経口投与することを特徴とするウシ新生仔のロタウイルス感染症予防及び治療法。

3. 発明の詳細な説明

「産業上の利用分野」

本発明はウシ新生仔のロタウイルス感染症の予防及び治療に有効を奏する未変生乳清蛋白質の製

(1)

(2)

法及び除製法によって製造した未変生乳清蛋白質を用いたロタウイルス感染症の予防及び治療法に関するものである。

「従来の技術」

畜産分野にあって和牛、特に黒毛和種の肥育による高級牛肉の生産は、自由化の嵐が目前に迫ったわが国畜産業界にあって、将来も希望が持てる分野の一つとされている。しかしウシ新生仔は、母親から胎盤経由で免疫グロブリンをもらって生まれるヒトと違い、免疫グロブリンを全く持たずに生まれてくることになる。そこで出生直後から免疫グロブリンを多量に含む初乳を十分に摂取させ、受動免疫をする必要があることは繰り返し説かれてきた。

一方、十分に初乳を与えても10～15%のウシ新生仔が死亡していることから明らかなように、子ウシは多種多様な病原体に周囲を取り巻かれていて、初乳由来の免疫グロブリンだけではこれらの病原体に対応しきれない事態も起こり得る。出生直後のウシ新生仔に最初に感染し、下痢を起こ

(3)

まれ、比較的長期にわたってウイルスが排泄され、感染性が高いことと相俟って容易に感染が広がる傾向がある。

一旦ロタウイルスが侵入すると、常在化して発生が繰り返されるのが特徴である。感染を経験した牛舎では、母牛が高率に抗体を保有し、子ウシは初乳中の抗体によって受動免疫が与えられる。しかし、初乳中の抗体は急激に減少、消失するので、生後3～4日頃から発病率が高まる。これは乳汁中の抗体が消失する時期に相当するためとされている。ロタウイルス感染症のような腸管粘膜の感染症では、初乳から血中に移行した抗体は感染防御に効果がない。

発病は早い場合は生後12時間から始まり、突然黄色水様便を排泄し、脱水、衰弱するが、普通は6～8時間で回復する。罹患率が高いが、致死率は低く0～50%である。しかしコロナウイルス、大腸菌、肺炎球菌などの混合感染は重症が高く、症状と予後を著しく悪化させる。病変は小腸に現れ、絨毛上皮細胞に顕著な変化が起こる。

(5)

させる可能性が高いのはロタウイルスである。このウイルスはヒト、ウシ、ニワトリなどに共通の病原性ウイルスで、新生仔に感染し激しい下痢を起こすばかりか、致命的な混合感染の原因にもなるウイルスである。

電子顕微鏡で見たロタウイルスは、恰も車輪のように見えるところから、ラテン語の「車輪」ロタに因んでこう命名された。1969年米国で発見されて以来、世界中でその存在が確認されている。

しかし、ウシのロタウイルスは、その抗原性が単一ではなく、多数の型が認められていて、このことがワクチンによる予防を著しく困難にしている。

したがって、従来のワクチン接種による予防法は実際上殆ど採用されておらず、現在迄のところあらゆる型のロタウイルスに対応し得る有効な予防治療手段はない。

ロタウイルス罹患による下痢の発症は冬期に集中することが特徴で、新生仔に限って流行が認められる。発病ウシの糞便には多量のウイルスが含

(4)

また一方、哺乳動物の乳汁、特に初乳中には多量の免疫グロブリンが分泌されることが知られている。前述したように、ロタウイルスが仔牛で免疫系の未成熟の幼若動物に感染することからみれば、乳汁中にはロタウイルスの抗原を認識し、それと結合する抗体が含まれていても不思議ではない。事実、平均的にみると、最も豊富な乳汁である牛乳中には、ウシのロタウイルスに対する抗体が高い力価で含まれていることが判っている。したがって、初乳中に含まれる抗ロタウイルス抗体を、ウシ新生仔のロタウイルス感染症の予防及び治療に応用することが考えられる。そしてまたその際に関連する主要な問題点は、①1～Ⅳ型適合全てのロタウイルスに対応する中和抗体を揃えること、②抗体投与の時期、③抗体投与量、④抗体の製剤化法の四点である。本発明者らは鋭意研究の結果、これらの問題点を解決し、効果的なウシ新生仔のロタウイルス感染症の予防及び治療法を確立し、本発明を完成するに至った。以下、更に詳細に説明する。

(6)

「課題を解決するための手段」

ロタウイルスは血清型からⅠ～Ⅳ型に分類されるが、その流行には地域差がある。したがって、Ⅰ型ロタウイルスに対し高い中和抗体価を持つ免疫グロブリンであっても、Ⅱ型のロタウイルス感染を有効に防御できるとは限らない。また、乳牛の抗体の保有状況にも、大きな個体差があることが知られている。したがって、ウシ新生仔に免疫グロブリンを経口投与し、ロタウイルスに対する受動免疫を与えるためには、あらゆる血清型のロタウイルスに対し高い中和抗体を持つ免疫グロブリンを揃えることが望ましい。このような免疫グロブリンは、いろいろな地域のできるだけ多数のウシから集めた初乳を混合し、免疫グロブリンを抽出することで達成することができる。

また、これまでウシ新生仔に初乳を充分に与える必要性は知られてきたが、どの程度に与えればよいかは不明だった。更に、母牛はあらゆるロタウイルスに対する中和抗体を持っているとは限らないので、初乳から抽出した免疫グロブリンに富

(7)

満蛋白質を粉末とし、この粉末を種々の電解質溶液、例えばリンゲル、タイロッド液などの粉末と混合し、使用する前に水に溶解する方式である。免疫グロブリンは水には非常に溶け難いが、電解質溶液には比較的よく溶けるからである。さらにロタウイルスによる下痢症で水分及び電解質を喪失したウシ新生仔にとって、免疫グロブリンと同時にこれらの成分を補給することは有力な治療手段だからである。

更にまた、免疫グロブリン製剤の効力を一層高めるためには、次のような方法を採用すればよい。前記の生理活性蛋白質を5～8%にブドウ糖を強化した10～50倍量のタイロッド液に溶解した後、免疫グロブリンと等量乃至3倍量に相当する油脂を加え、乳化剤としてレシチン或いは牛乳脂肪球被膜を加えて乳化する。この免疫グロブリン乳化液のウシ新生仔のロタウイルス感染症予防効果は、単に免疫グロブリンを電解質溶液に溶解して与えた場合と比べて2～3倍高い。さらに注目値することは、巨大分子であるにも拘わらず相当量の

(9)

む乳清蛋白をどのくらい、何時与えれば良いのかも全く知られていなかった。本発明者らはこの点を検討し、ウシ新生仔は出生直後から充分に初乳を与えた上で、さらに50～65%の免疫グロブリンを含む初乳の乳清蛋白分画を、出生24時間以内に、一日一回5gを経口的に与えれば、効果的にロタウイルスによる下痢症を抑制し、さらに合併症が起こることを予防できることを知見した。

また、製剤化はウシ新生仔に免疫グロブリンを経口投与する際にも必須である。そして、製剤化は単にウシ新生仔が好んで経口的に摂取する剤形としてばかりでなく、免疫グロブリンを含む初乳の生理活性蛋白質が消化管の作用部位に到達し、作用を発揮できるような剤形であることも必要である。例えば、哺乳動物の消化管は粘液層で覆われていて、単に水に溶解して与えただけでは、生理活性蛋白質は必ずしも作用部位である腸管粘膜に到達するとは限らない。本発明者らはこの目的に合致した剤形として、次の二つを見出した。

最初の剤形は、免疫グロブリンに富む初乳の乳

(8)

免疫グロブリンが、腸管の吸収膜壁を越えて体内に吸収されることである。

したがって、油脂と共に乳化し経口的に摂取させる技術は、免疫グロブリンを腸管から吸収させる方法として注目値する。

「実施例」

以下、初乳から抽出した免疫グロブリンに富む乳清蛋白質を用いて、本発明者らが達成した発明の実施例を、①ロタウイルス感染症の予防、治療のための投与量及び投与時期の設定、②免疫グロブリンに富む乳清蛋白の製剤化法、③活性増強法の観点から実施例を記述する。

〔実施例1〕

南九州、長野県及び北海道十勝平野から集めた凍結初乳を各150kgづつ混合してから40℃に加熱溶解し、酢酸を添加してpH4に調節した。次に重心分離してクリームを除去した脱脂初乳に、チーズ製造に準じてレンネット0.01%、CaCl₂ 0.02%を加えて1時間攪拌しながらカゼインを完全にカーク化した。この液をさらに遠心分離し、凝集し

(10)

たカゼインカード部分 130kg とホエイ部分 300kg とを分離した。ホエイにNaOHを加えてpH 6~7に修正してから、フィルタープレスを通して濃縮し濃液を得た。この濃液を分画分子量10万の限外膜濃縮器を通過させ、3倍濃縮を5回繰り返して、濃縮液80kgを得た。この濃縮液を無菌濃縮し、凍結乾燥して約8kgの粉末初乳ホエイ蛋白を得た。本粉末の蛋白含量は95%、免疫グロブリン含量は65%、ラクトフェリン含量は5.7%であった。

表1 各地の初乳蛋白粉末のロタウイルス中和抗体価

ロタウイルス	抗ウイルス活性(%)			
	南九州	長野県	北海道十勝	混合
I	1: 31250	1: 6250	1: 1250	1: 31250
II	1: 1250	1: 1250	1: 6250	1: 6250
III	1: 31250	1: 6250	1: 1250	1: 31250
IV	1: 6250	1: 6250	1: 6250	1: 6250
V	1: 1250	1: 6250	1: 31250	1: 31250
VI	1: 6250	1: 31250	1: 1250	1: 6250
VII	1: 6250	1: 6250	1: 31250	1: 6250

(*) 抗ウイルス活性・1gの免疫グロブリンがNA-104

(11)

投与した。対照群にはブドウ糖5%を含む電解質補液300mlのみを与えた。子ウシは一ヶ月間飼育観察して、下痢の有無及び感染症による死亡を記録した。

表2 初乳乳清蛋白の黒毛和種新生仔における下痢発症と感染死予防効果

	頭数	下痢の程度			生存	死亡
		-	+	++		
免疫グロブリン投与群	62	8	19	34	58	9 (14.5%)
対照群	184	0	33	101	59	75 (56.0%)
有意差検定	$P < 0.01$ in χ^2 test.				$P < 0.01$ in χ^2 test.	

結果は表2から明らかなように初乳乳清蛋白を与えると、下痢及び感染症による死亡が高度に有意に抑制された。

〔実施例2〕

実施例1の方法によって初乳から分離、濃縮、粉末化した免疫グロブリンに富む乳清蛋白1部に、ブドウ糖を強化したタイロード液粉末6部を加えて混合する。ブドウ糖強化タイロード液粉末の組

(13)

細胞に感染したロタウイルスのブラックを80%減少させる殺菌効率で表した。

表1に示すように、わが国南北の乳牛から採取した初乳免疫グロブリンのロタウイルスに対する中和抗体価は特徴があり、南九州産はI型及びII型に対する中和抗体価が高く、北海道産はこれらの型に対する中和抗体価が低い代わりにV型及びVI型に対する中和抗体価が高い。本州の中央に位置する長野県産は両者の中間の中和抗体価を示した。

したがって、これら各産区から集めた初乳を混合することによって、表1に示すように各血清型に平均して強い抗ウイルス活性を示す乳清蛋白粉末を得ることができる。

上記の三地域から集めた初乳を混合して抽出した乳清蛋白を用い、ロタウイルス感染症が蔓延している冬期に各地の黒毛和種新生仔に経口投与して感染予防効果を検討した。尚、免疫グロブリンは、出生24時間以内に一回目として5gをブドウ糖5%を含む300mlの電解質補液に溶解してから経口投与し、以後、一日一回連続3~5日間経口

(12)

投与した。対照群にはブドウ糖5%を含む電解質補液300mlのみを与えた。子ウシは一ヶ月間飼育観察して、下痢の有無及び感染症による死亡を記録した。

成分は次の通りである。ブドウ糖 5.045g、塩化ナトリウム 0.800g、塩化カリ 0.02g、塩化マグネシウム 0.01g、塩化カルシウム 0.02g、第一リン酸ナトリウム 0.005g、重炭酸ナトリウム 0.100g。混合が終了したら全量の3~4%に相当する蒸留水を万遍なく撹拌して粉末に軽く湿り気を与え、充分に練り合わせてから、2mm (16~18mesh) のネットを備えた押し出し造粒機にかけて顆粒化し、次いで流動乾燥機にかけて温度70℃で25分間乾燥した。このようにして調製した顆粒の水分含量は5.5~7.5%であった。

〔実施例3〕

実施例2の方法によって調製した初乳免疫グロブリンに富む乳清蛋白製剤37.5gを300mlの水に溶解し、出生24時間以内のホルスタイン系新生仔に経口投与し、以後は一日一回連続5日間、37.5gを水300mlに溶かして経口投与した。対照群には乳清蛋白を含まない電解質補液のみを与えた。子ウシは投与が終了してから4週間にわたり下痢の有無及び感染症による死亡を観察した。

(14)

表3 初乳乳清蛋白製剤のホルスタイン系新生仔における下痢予防効果

	総数	下痢の程度				生存	死亡
		-	±	+	++		
乳清蛋白製剤投与群	37	25	6	3	3	37	0
対照群	45	9	12	11	13	43	2
統計的な有意差	$P < 0.01$ in χ^2 test.					ns.	

表3から初乳から抽出した乳清蛋白の下痢予防効果は明らかである。

(実施例4)

長野県産初乳から抽出した免疫グロブリンに富む乳清蛋白の抗ウイルス活性を向上させるために次のように製剤化した。まず実施例2で調製した初乳乳清蛋白の製剤22.5gを300mlの水に溶解し、さらに大豆油6gと牛乳脂肪球被膜0.3gを加えて超音波によって乳化した。この乳濁液300mlを出生24時間以内のホルスタイン系新生仔に経口投与し、さらに翌日から一日一回連続5日間300ml

(15)

表5に示すように乳清蛋白を乳化して経口投与した場合でも、ロタウイルス感染による下痢を高度に有意に抑制した。この試験においては、乳清蛋白の投与量を実施例3の一日当たり5gから3gに減少させたにも拘わらず、下痢予防効果は実施例3と同等乃至やや優れていた。

(実施例5)

実施例4において調製した初乳乳清蛋白の粉末化を試みた。実施例4に示す方法で調製した乳濁液5lに乳糖300g、バイオアイソレイト社製の乳清蛋白(Whey protein isolate, WPI) 100gを加え、薄粉させた後、凍結乾燥することによって吸湿性の粉末800gを得た。この粉末16gを水100mlに加え、よく懸拌すると初乳乳清蛋白1gを含む乳濁液を容易に再生することができる。

「発明の効果」

本発明によれば、各血清型のロタウイルスに対し高い中和抗体を持つ免疫グロブリンを全て揃えて含有する未変性乳清蛋白製剤を製造することができる。また、該未変性乳清蛋白製剤をウシ新生仔に

(17)

の乳濁液を経口投与した。子ウシは引き続き4週間観察し、ロタウイルスによる下痢の有無を観察した。尚、対照群の子ウシには補液のみを経口投与した。この際、使用した初乳乳清蛋白の分析値は下記の通りである。

表4 初乳の乳清蛋白組成

項目	組成(%)
蛋白質	75~95
内、免疫グロブリン	50~65
ラクトフェリン	3.5~8.0
脂質	<1.5
乳糖	<3.0
灰分	<1.0

表5 乳化した乳清蛋白の下痢予防効果

	総数	下痢の程度				生存	死亡
		-	±	+	++		
乳清蛋白乳剤投与群	12	11	1	0	0	12	0
対照群	15	1	2	6	6	15	0
統計的な有意差	$P < 0.01$ in χ^2 test.					ns.	

(16)

経口投与することにより、ロタウイルス感染症を効果的に予防又は治療することができる。また、前記未変性乳清蛋白製剤を粉末として、これを電解質溶液の粉末と混合して製剤化することにより、生体活性蛋白質を作用部位である腸管粘膜到達させることができるものである。更にまた、前記未変性乳清蛋白製剤に対し中性脂肪を加えると共に乳化剤によって乳化させると、電解質溶液に溶解して与えるよりもさらに高い効果を得ることができるものである。

特許出願人 中外製薬株式会社
代理人 弁護士 杉山 一 夫



(18)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.